

## JP2001354680A

Publication Title:

HIGHLY STABLE ACID PHOSPHOLIPID AND METHOD FOR PRODUCING THE SAME

Abstract:

Abstract of JP 2001354680

(A) Translate this text PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain an acid phospholipid stable at normal temperature, and to provide a method for producing such a phospholipid. SOLUTION: This stable acid phospholipid is obtained by making the corresponding acid phospholipid and a vehicle coexistent. The other objective method for producing such a highly stable acid phospholipid is characterized by comprising the following process: the corresponding acid phospholipid and a vehicle are added to water at 0-50 deg.C followed by homogenizing the system and then making a vacuum drying to effect the moisture content of the final acid phospholipid to  $\leq 1$  wt.%.

-----  
Courtesy of <http://v3.espacenet.com>

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11) 特許出願公開番号  
特開2001-354680  
(P2001-354680A)

(43) 公開日 平成13年12月25日 (2001. 12. 25)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	データベース* (参考)
C 0 7 F 9/10		C 0 7 F 9/10	B 4 H 0 5 0
A 2 3 J 7/00		A 2 3 J 7/00	

審査請求 未請求 請求項の数 4 O L (全 6 頁)

(21) 出願番号	特願2000-172237(P2000-172237)	(71) 出願人	000004341 日本油脂株式会社 東京都渋谷区恵比寿四丁目20番3号
(22) 出願日	平成12年6月8日(2000. 6. 8)	(72) 発明者	仁科 淳良 埼玉県上尾市小泉378-41
		(72) 発明者	虎田 英之 茨城県つくば市春日2-17-14
		(72) 発明者	橋爪 諭 千葉県我孫子市布佐平和台5-9-3
		(72) 発明者	中野 善郎 茨城県つくば市梅園2-15-5
		Fターム(参考)	4H050 AA01 AA02 AB84 AC90 AD11 BB31 BC10 BC31 BC51 BE60

(54) 【発明の名称】 高安定性酸性リン脂質および製造方法

(57) 【要約】

【課題】高安定性酸性リン脂質およびその製造方法を提供する。

【解決手段】酸性リン脂質と賦形剤を共存させることにより安定な酸性リン脂質を製造する方法において、0～50℃の条件下で水に酸性リン脂質と賦形剤を添加し、均質化後、真空乾燥して水分を1%以下とすることを特徴とする高安定性酸性リン脂質の製造方法。

## 【特許請求の範囲】

【請求項１】酸性リン脂質と賦形剤を共存させることにより安定な酸性リン脂質を製造する方法において、０～５０℃の条件下で水に酸性リン脂質と賦形剤を添加し、均質化後、真空乾燥して水分を１％以下とすることを特徴とする高安定性酸性リン脂質の製造方法。

【請求項２】酸性リン脂質がホスファチジン酸またはホスファチジルセリンであり、賦形剤が炭水化物、蛋白質、ペプチドおよびアミノ酸からなる群より選択される１種または２種以上であり、賦形剤の量が酸性リン脂質１重量部に対して、０．０１～１００重量部である請求項１記載の高安定性酸性リン脂質の製造方法。

【請求項３】賦形剤である蛋白質が、ラクトアルブミンまたはゼラチンで、賦形剤であるペプチドが卵白ペプチドである請求項２記載の高安定性酸性リン脂質の製造方法。

【請求項４】請求項１～３の製造方法によって得られる酸性リン脂質であって、保存温度４０℃、相対湿度７５％の条件下で６カ月保存中に酸性リン脂質の減少量が１０％以下、過酸化物質の上昇が１以下である高安定性酸性リン脂質。

## 【発明の詳細な説明】

## 【０００１】

【発明の属する技術分野】本発明は、安定性の高い酸性リン脂質およびその製造方法に関する。

## 【０００２】

【従来の技術】酸性リン脂質は、リン脂質の酸性物であり、例えば、ホスファチジルセリンまたはホスファチジン酸の塩型のものは牛脳や植物から抽出されたり、他のリン脂質を出発原料とする塩基交換反応または加水分解により製造されてきた（特開昭６３－３６１９０号公報、特開昭６３－３６１９１号公報、特開昭６３－３６７９２号公報、特開平２－７９９９０号公報、特開平４－１７１９７６号公報）。しかし、前記に開示された先行技術は、反応後にホスファチジルセリンまたはホスファチジン酸を塩の形で取り出すものであって、酸型のリン脂質が自然界に存在し難く得ることは困難であった。

【０００３】一方、酸性リン脂質については、近年、様々な生理活性が見出されており、特にホスファチジルセリンは学習効果を高めるような脳機能改善効果や、抗ストレス効果等の生理活性が見出されており、医薬品や食品等への応用が期待されている。しかし、これら酸性リン脂質は酸型の状態で化学的に不安定であり、酸化や加水分解等の品質劣化を受けやすかった。このため、現在市場では試薬グレードの酸性リン脂質が冷凍保存状態で流通していた。ところが、酸性リン脂質は、塩型のものと比較し、他の油脂との相溶性に優れ、製品加工を行いやすい利点があり、塩型とは異なる生理活性を有することから、常温で、高安定性酸性リン脂質を製造する方法が望まれていた。

【０００４】特開昭５４－１２６２０６号公報には、ホスファチジルコリン等のリン脂質含有油脂に（例えば、オクタデシルアクリルアミド－Ｎ、Ｎ－ジメチルアクリルアミドの共重合体を添加して、リン脂質の褐変を抑える方法が開示されているが、この方法で、酸性リン脂質の酸化、加水分解が抑制されるか否かについては記載がない。特開平８－５３６４３号公報には、アルギルアクリルアミド、Ｎ－置換アクリルアミドからなる水溶性高分子で被覆することによるリン脂質等の膜の安定化技術が開示されている。しかし、この方法で、酸性リン脂質の酸化、加水分解が抑制されるか否かについては記載がない。また、この技術は、膜の安定化技術であり、バルクの酸性リン脂質には適用できないなど問題があった。

【０００５】特表平８－５０５４０３号公報、特表平１１－５０２８５１号公報では、サイトカイン等の蛋白質を用いて、リン脂質を含む疎水性脂質を賦形剤として添加し、蛋白質を安定化する技術が開示されている。しかし、この方法で、酸性リン脂質の酸化、加水分解が抑制されるか否かについては記載がない。また、この技術は、蛋白質の安定化技術であり、酸性リン脂質には適用できない。

## 【０００６】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、常温で、安定性のある酸性リン脂質およびその製造方法を提供することにある。

## 【０００７】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、前記問題点に鑑み鋭意検討した結果、特定の条件下に酸性リン脂質と賦形剤とを配合すると、常温でも、酸性リン脂質が著しく安定化する知見を得て、本発明を完成させるに至った。即ち、本発明は、次の〔１〕～〔４〕である。

【０００８】〔１〕 酸性リン脂質と賦形剤を共存させることにより安定な酸性リン脂質を製造する方法において、０～５０℃の条件下で水に酸性リン脂質と賦形剤を添加し、均質化後、真空乾燥して水分を１％以下とすることを特徴とする高安定性酸性リン脂質の製造方法。

【０００９】〔２〕 酸性リン脂質がホスファチジン酸またはホスファチジルセリンであり、賦形剤が炭水化物、蛋白質、ペプチドおよびアミノ酸からなる群より選択される１種または２種以上であり、賦形剤の量が酸性リン脂質が１重量部に対して、０．０１～１００重量部である前記〔２〕の高安定性酸性リン脂質の製造方法。

【００１０】〔３〕 賦形剤である蛋白質が、ラクトアルブミンまたはゼラチンで、賦形剤であるペプチドが卵白ペプチドである前記の〔１〕の高安定性酸性リン脂質の製造方法。

【００１１】〔４〕 前記の〔１〕～〔３〕の製造方法によって得られる酸性リン脂質であって、保存温度４０℃、相対湿度７５％の条件下で６カ月保存中に酸性リン脂質の減少量が１０％以下、過酸化物質の上昇が１以下

である高安定性酸性リン脂質。

【0012】

【発明の実施の形態】本発明に用いるリン脂質は、例えば、レシチン、ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルグリセロール、リゾレシチン等が挙げられる。なかでもホスファチジルセリン、ホスファチジン酸が好ましく挙げられる。用いるリン脂質は、天然資源から抽出したもの、あるいは合成したものの如何を問わず使用できる。また、市販のもの、または公知の方法で調製したものを使用しても良い。例えば、大豆、脱脂大豆、卵黄等から抽出したものを単独で用いてもよいし2種以上組み合わせ用いてもよい。また、動物、植物等の起源については特に限定されない。例えば、大豆レシチン、脱脂大豆レシチン、卵黄レシチン、ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルグリセロール、リゾレシチン等から塩基交換反応もしくは加水分解により得られたものを使用することも可能である。本発明に用いる酸性リン脂質としては、塩型のリン脂質を酸で処理することによって得られる。前記の酸としては、例えば、胃酸、酢酸、コハク酸、リンゴ酸、フマル酸、マレイン酸、クエン酸、塩酸、硫酸、硝酸、リン酸、フィチン酸等が挙げられる。これらの中から選ばれる1種または2種以上を組み合わせ用いることができる。陽イオンの除去効果の点から塩酸、硫酸、硝酸、リン酸の無機酸、フィチン酸等の有機酸を使用することがより好ましい。

【0013】また、緩衝液溶液、例えば、胃酸-胃酸ナトリウム緩衝液、グリシン-塩酸緩衝液、酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液、クエン酸-クエン酸ナトリウム緩衝液、リン酸緩衝液等を所定のpHに調整して用いることがより望ましい。酸または緩衝液の添加量は、塩型リン脂質1molに対し、酸を1~100mol、好ましくは15~60mol、より好ましくは20~50molに設定する。添加量が1mol未満では酸の効果が十分でなく、高純度酸性リン脂質を製造することができない。また、酸の添加量が100molを越えると、加水分解等の副反応が生じるので望ましくない。反応系に添加する酸の温度は0~50℃、好ましくは5~30℃、より好ましくは7~20℃である。温度が0℃未満では酸の粘度が上昇したり凝固するため取り扱いが難しくなる。また、酸の温度が50℃を越えると、加水分解等の副反応が生じるので望ましくない。また例えば酸性リン脂質の市販品としては、牛脳由来ホスファチジルセリン（純度98%：シグマ社製品）、大豆由来ホスファチジルセリン（純度98%：シグマ社製品）、ジバルミトールホスファチジン酸（純度99%：シグマ社製品）等が好ましいものとして挙げられる。

【0014】本発明に用いるリン脂質の構成脂肪酸は、同一または異種であり、炭素数8~24の飽和または不飽和の脂肪酸である。例えば、カプロン酸、カプリン

酸、ラウリン酸、ミリスチン酸、ステアリン酸、ペヘン酸、アラキジン酸、パルミトオレイン酸、オレイン酸、リノール酸、αおよびγ-リノレン酸、エルシン酸、アラキドン酸、エイコサペンタエン酸、ドコサヘキサエン酸、テトラコサテトラエン酸等が挙げられる。なかでも、オレイン酸、リノール酸、エイコサペンタエン酸、ドコサヘキサエン酸が生理活性の面から好ましい。

【0015】本発明に用いる賦形剤としては、例えば、炭水化物、蛋白質、ペプチドおよびアミノ酸が挙げられる。前記の炭水化物としては、例えば、澱粉、デキストリン、セルロース及びその加水分解物、ブドウ糖、果糖などの単糖類、マルトース、乳糖などの二糖類、アラビアガム、キサンタンガム、ローカストビーンガム、プルラン等の多糖類等が挙げられる。これらの1種または2種以上を組み合わせ用いてもよい。例えば、市販品として、ラクトース（ラブリノ社製品）、SD-20（シクロデキストリン：塩水港精糖（株）製品）、パインデックス（デキストリン：松谷化学（株）製品）等が好ましい物として挙げられる。

【0016】前記の蛋白質としては、動物および植物系の蛋白質が用いられる。動物性蛋白質としては、例えば、カゼイン、コラーゲン、ホエイ蛋白質、卵蛋白質、魚蛋白質等が挙げられる。またさらに、植物性蛋白質としては、大豆蛋白質、小麦蛋白質、トウモロコシ蛋白質等が挙げられる。前記のペプチドとしては、前記の蛋白質の分解物またはその塩が挙げられ、例えば、卵白ペプチド、魚ペプチド、乳蛋白ペプチド等が挙げられる。前記のアミノ酸としては、前記のペプチドの分解物、あるいは各種アミノ酸を使用することができる。この中でも供給安定性の面から、ゼラチン、卵白ペプチド、ラクトアルブミン、カゼイン等が好ましく挙げられる。例えば、市販品として、低分子コラーゲンパウダーSPH（雪印食品（株）製品）、ラクプロゲン80（ラクトアルブミン：MDフーズイングレディエントジャパン（株）製品）、マグネシウムカゼインートS（DMVジャパン（株）製品）、CE90F（ホエイペプチド：DMVジャパン（株）製品）、EP-3（卵白ペプチド：キュービー（株）製品）等が好ましいものとして挙げられる。

【0017】本発明で用いる賦形剤の使用量は、原料となる酸性リン脂質1重量部に対して0.01~100重量部、好ましくは、0.2~50重量部、より好ましくは0.5~10重量部である。賦形剤の添加量を酸性リン脂質1重量部に対して100重量部より多くしても、それに見合うだけの著しい安定化の向上効果が認められず、0.01重量部未満では賦形剤による安定化効果が得られない。

【0018】本発明を実施する形態は、原料となる酸性リン脂質1重量部に対して0.01~100重量部の範囲の賦形剤を攪拌槽にて水に溶解させ、次いで酸性リ

ン脂質の粉末を添加して均質化させることにより、酸性リン脂質を賦形剤で包含させる。包含は、0～50℃の範囲で行う。50℃より高くなると、賦形剤である蛋白質の変性を生じることや、酸性リン脂質の分解を伴う、0℃より低くなると水相が凝固してしまう。包含を行う際にはホモゲナイザー、ポリトロン、マイクロフルイダイザー、ホモミキサー等の均質機を併用することができる。なお、反応は窒素還流下で行うことによりリン脂質に含まれる脂肪酸の劣化を防ぐことができる。その後、真空ベルト乾燥機、真空凍結乾燥等の真空乾燥機により乾燥し、最終製品中の水分を1%以下とする。

【0019】本発明の方法で製造した酸性リン脂質は、保存温度40℃、相対湿度75%の条件下で6ヵ月保存中に酸性リン脂質の減少量が10%以下、過酸化物質の上昇が1以下を達成できる安定化を著しく向上させたものである。

#### 【0020】

【発明の効果】本発明の高安定性酸性リン脂質の製造方法は、特定の条件下で、原料の酸性リン脂質と特定の賦形剤を添加して、安定化を図るもので、0～50℃の条件下で水に酸性リン脂質と賦形剤を添加し、均質化後、真空乾燥して水分を1%以下とする簡単な方法により安定化した酸性リン脂質を得ることができる。様々な生理活性を有する酸性リン脂質を安定化することにより、長期間、品質を維持することができ、工業的に、健康食品や医薬品等へ応用することができる。

#### 【0021】

【実施例】本発明を実施例に基づいて説明する。用いた測定方法、評価方法を示す。

##### 1. リン脂質の定量

高速液体クロマトグラフィー（ギルソン社製、機種モデル303）を用いて行った。固定相にはシリカゲルカラム（径4.6mm×長さ250mm）を用い、また移動相にはアセトニトリル：メタノール：10mMリン酸二水素アンモニウム＝612：289：100の混合溶媒を用い検出は、紫外線UV波長202nmにおける吸収を測定することにより定量した。

##### 2. 過酸化物質（POV）の測定

酸化の指標となるPOVは日本油化学協会制定の基準油脂分析試験法2.4.12～86に準じて測定した。

##### 3. 水分の測定

試料中の水分は、カールフィッシャー水分計、三菱化学（株）製、機種CA-06）を用いて測定した。

##### 4. 安定性の評価方法

安定性の評価は、粉末試料を開放状態で、40℃、相対湿度75%の恒温槽内で6ヶ月間保存後、酸性リン脂質の含量を高速液体クロマトグラフィー（HPLC）で測定し、その残存率を求めた。

##### 5. 酸化安定性

前記の方法により初期および粉末試料を開放状態で、4

0℃、相対湿度75%の恒温槽内で6ヶ月間保存後、過酸化物質（POV）の測定を行った。

#### 【0022】実施例1

ラクトアルブミン0.05gと水3gを混合し超音波洗浄機で攪拌し溶解させ、次いで酸性の牛脳由来ホスファチジルセリン（純度98%：シグマ社品）0.5gを添加後、窒素置換を行いながら30℃でポリトロン（キネマチカ社製）を用いて15分間均質化した。均質化後に真空凍結乾燥を行い、粉末0.54gを得た。試料の水分を前記の方法により測定した結果、0.2%であった。

#### 【0023】実施例2

シクロデキストリン500gを水3000gに入れ、プロペラ攪拌機で溶解し、次いで酸性の大豆由来ホスファチジルセリン（純度98%：シグマ社品）500gを添加後、10℃でホモミキサーにて窒素置換を行いながら15分間均質化した。反応後に真空ベルト乾燥を行い、粉末990gを得た。同様に水分を測定した結果、0.1%であった。

#### 【0024】実施例3

カゼインナトリウム2140gと水5000gをホモミキサーにて攪拌し溶解させ、次いで酸性のジハルミトールホスファチジン酸（純度99%：シグマ社品）500gを添加後、1℃でホモミキサーにより15分間均質化した。均質化後に凍結乾燥を行い、粉末2580gを得た。試料の水分を測定した結果、0.3%であった。

#### 【0025】実施例4

ゼラチン100gと水800gを50℃に加温後プロペラ攪拌により溶解させ、45℃に冷却した後に大豆由来ホスファチジルセリン（純度98%：シグマ社品）1.9gを添加後、窒素置換を行い、ソニファイヤー（ブランソン社製）により15分間均質化した。反応後に凍結乾燥を行い、粉末101gを得た。試料の水分を同様に測定した結果、0.1%であった。

#### 【0026】比較例1

ラクトアルブミン0.05gと水3gを混合し超音波洗浄機で攪拌し溶解させ、次いで酸性牛脳由来ホスファチジルセリン（純度98%：シグマ社製品）0.5gを添加後、窒素置換を行いながら30℃でポリトロン（キネマチカ社）を用いて15分間均質化した。均質化後に温風乾燥を行い、粉末0.48gを得た。試料の水分を同様に測定した結果、3.0%であった。

#### 【0027】比較例2

シクロデキストリン2gを水3000gに入れ、プロペラ攪拌機で溶解し、次いで酸性の大豆由来ホスファチジルセリン（純度98%：シグマ社品）500gを添加後、10℃でホモミキサーにて窒素置換を行いながら15分間均質化した。反応後にスプレードライを行い、粉末459gを得た。試料の水分を同様に測定した結果、5.0%であった。

# 【0028】比較例3

カゼインナトリウム2140gと水5000gをホモミキサーにて攪拌し溶解させ、次いで酸性のジナルミトールホスファチジン酸（純度99%：シグマ社製品）500gを添加後、60℃でホモミキサーにより15分間均質化した。均質化後に温風乾燥を行い、粉末2250gを得た。試料の水分を同様にして測定した結果、10%であった。

# 【0029】比較例4

ゼラチン100gと水800gを50℃に加温後プロペラ攪拌により溶解させ、45℃に冷却した後に酸性大豆由来ホスファチジルセリン（純度98%：シグマ社製品）1.9gを添加後、さらにプロペラ攪拌により15分間攪拌した。反応後にスプレードライを行い、粉末89gの粉末を得た。試料の水分を同様にして測定した結果、3.5%であった。

# 【0030】試験例1

実施例1～4、比較例1～4で得られた粉末を40℃、

相対湿度75%の恒温槽内で6ヶ月間保存後、ホスファチジルセリンまたはホスファチジン酸の残存量をHPLCにて測定し、下記に示す計算式で残存率を求めた。  
残存率(%) = (6ヶ月後の酸性リン脂質含量/初期の酸性リン脂質含量) × 100その結果を表1および2に示す。

# 【0031】試験例2

実施例1～4および比較例1～4で得られた粉末を40℃、相対湿度75%の恒温槽内で6ヶ月間保存後、POVの測定を行った。初期値および6ヵ月後のPOVを表1および2に示した。

# 【0032】試験例3

原料のホスファチジルセリン及びホスファチジン酸を前記の試験例の方法と同様にして安定性を評価した。結果を比較例5～7として表3に示す。

# 【0033】

# 【表1】

表1

		実 施 例			
		1	2	3	4
仕 込 み	原料 酸性リン脂質 量(g)	牛脂PS 0.5g	大豆PS 500g	PA 500g	大豆PS 1.9g
	賦形剤 量(g)	サリチル酸 0.05g	サリチル酸 500g	サリチル酸 2140g	ゼラチン 100g
処 理	均質化 処理の有無 温度(℃)	あり 30	あり 10	あり 1	あり 45
	時間(分)	15	15	15	15
	乾燥方法	真空凍結乾燥	真空 <sup>1</sup> 外乾燥	真空凍結乾燥	真空 <sup>1</sup> 外乾燥
結 果	収量g 収率(%)	0.54 98.2	99.0 99.0	2580 99.7	101 99.2
	水分(%)	0.2	0.1	0.3	0.1
	残存率(%)	99	96	98	98
果	初期POV*	0.1	0.3	0.1	0.3
	経時試験後POV	0.3	0.5	0.4	0.4

【0034】なお表中に用いた略号は次のとおりである。

PS：ホスファチジルセリン（酸型）

PA：ホスファチジン酸。

また、POVの単位はmeq/kgである。

# 【0035】

# 【表2】

表2

		比較例			
		1	2	3	4
仕 込 み	原料 酸型リン脂質 量 (g)	牛脳PS 0.5 g	大豆PS 500 g	PA 500 g	大豆PS 1.9 g
	賦形剤 量 (g)	サトウシロ 0.05 g	サトウシロ 2 g	サトウシロ 2140 g	ゼラチン 100 g
処 理	均質化 処理の有無				
	温度 (°C)	あり 30	あり 10	あり 60	あり 45
	時間 (分)	15	15	15	15
結 果	乾燥方法	温風乾燥	スプレッド ドライ	温風乾燥	スプレッド ドライ
	収量 g	0.48	459	2250	89
	収率 (%)	87.3	91.4	85.2	87.3
	水分 (%)	8.0	5.0	10	3.5
	残存率 (%)	52	47	41	20
果	初期POV	5.9	4.1	8.1	9.1
	経時試験後POV	139	89	77	91

【0036】

【表3】

表3

		比較例		
		5	6	7
	原料 酸型リン脂質	牛脳PS	大豆PS	PA
	水分 (%)	3	5	10
結 果	残存率 (%)	13	9	19
	初期POV	0.1	0.3	0.1
果	経時試験後POV	159	101	49

【0037】6ヵ月後の原料のホスファチジルセリンとホスファチジン酸および比較例1～4の場合には酸性リン脂質の残存率は少ないのに比べて、本発明の実施例1～4では酸性リン脂質の残存率が高いことがわかる。また、初期と6ヵ月後のPOVを比較すると原料のホス

ファチジルセリンとホスファチジン酸および比較例1～4は共に値が大きくなり、酸化が進行しているのに対し、実施例1～4には酸化劣化がほとんど認められなかった。以上の結果から、本発明の実施例に示した酸性リン脂質は著しく安定していることが分かる。